

## 新規 研究 マンナン加水分解酵素とその遺伝子に関する

著者	丸山 穰
号	619
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16234">http://hdl.handle.net/10097/16234</a>

氏 名(本籍)	まる 丸	やま 山	ゆたか 穰
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 6 1 9 号		
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)		
学 位 論 文 題 目	新規 $\alpha$ マンナン加水分解酵素とその遺伝子に関する研究		
論文審査委員	(主 査)	教 授	中 島 佑
		教 授	神 尾 好 是
		教 授	五 味 勝 也

# 論文内容要旨

## 新規 $\alpha$ マンナン加水分解酵素とその遺伝子に関する研究

### 序論

多糖類は生体成分として、核酸や蛋白質、脂質とともに主要な成分である。多糖の生体内における役割は、単に細胞の支持物質や貯蔵物質に留まることはない。生物のつくる多様な多糖類と生命現象との関連はしだいに明らかにされてきており、多糖類の構造と機能の相関に関する研究は、今日、あらためて大きな関心を集めている。

1950年代以降、蛋白質や核酸の分子構造及びその機能の解析、そして応用は目覚ましく発展した。それらの成果は基質特異性の明らかにされた酵素の利用に負うところが大きい。多糖は蛋白質や核酸と同様に典型的な鎖状分子でありながら分子生物学的解析はあまり進んでいない。これは、多糖の場合、たとえその構成単位(単糖)が決定できたとしても、各々の結合様式やその順序、そして鎖の長さも多様であり解析が極めて困難なためである。そしてその解析結果は往々にして平均構造の解明に留まってしまう。

このように生体を構成する主要成分として"最後に残された"領域である多糖の、生物生体内における生合成や代謝、機能、また、自然界における消費(分解)の解析を考えたとき、それぞれに関与している酵素を同定することが有効であると考えられる。近年のゲノム解析プロジェクトの成果で、多糖の生合成や代謝、資化に関与すると考えられる酵素が挙げられてきている。この成果を活かすためには多糖の精密な構造が明らかにされる必要がある。多糖の構造の解析も、その生合成/代謝に関わる酵素の解明も、車の両輪のようにどちらか一方が欠けても前進する事は難しい。

糖鎖の構造解析の手法としてはその構造に依存した化学的分解法が用いられ、成果をあげてきた。しかし、この方法では副生成物の影響を排除することが難しい。また、平均構造としての知見しか得られないことが多い。糖の様々な結合様式に対応して、それぞれ特異的に作用する一連の加水分解酵素群を利用することができれば糖鎖の構造解析は飛躍的に進展するであろう。本研究ではこの観点から、糖の結合様式に高い特異性をもつ酵素群を単離し、その性質を調べることにした。

糖蛋白質糖鎖は情報伝達をになう重要な働きがあることが明らかにされている。糖蛋白質糖鎖のうちN結合糖鎖の基本骨格はマンノースを構成糖とし、また、真菌類の細胞壁の最表層は、 $\alpha$ マンノースのみで構成される $\alpha$ マンナン、あるいは $\alpha$ マンノースを主成分としたヘテロ多糖で覆われている。天然界には $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -1,6の三種類の $\alpha$ マンノシド結合が存在する。 $\alpha$ マンナン型糖鎖の構造解析には、これら三種類の結合を認識し特異的に加水分解する酵素を用意することが求められる。

現在までに $\alpha$ マンノシド結合を加水分解する酵素として発見され遺伝子情報が明らかにされているものとしては、 $\alpha$ -mannosidase (EC 3.2.1.24)、 $\alpha$ -1,2-mannosidase (EC 3.2.1.113)、 $\alpha$ -1,3-1,6-mannosidase (EC 3.2.1.114)がある。これらは全て真核生物に由来する酵素であり主に、細胞内で糖蛋白質が生合成される際の quality control (品質管理) における糖鎖のプロセッシングに関与していると考えられている。

我々は各 $\alpha$ マンノシド結合に特異的に作用する酵素を、その生産性を考え、細菌より検索した。これまでに、 $\alpha$ -1,2-mannosidase、 $\alpha$ -1,3-mannanase、 $\alpha$ -1,6-mannanaseを産生する各細菌を土壤中より単離し酵素を精製し諸性質を決定した。

本博士論文では  $\alpha$ -1,2-mannosidase,  $\alpha$ -1,6-mannanase について述べる。

## 第一部 *Bacillus* sp. M-90 の $\alpha$ -1,2-mannosidase について

### 第一章 *Bacillus* sp. M-90 の $\alpha$ -1,2-mannosidase の精製と諸性質

#### ・生産菌の検索、同定

真菌型マンノプロテイン糖鎖に有効に作用する酵素を得るために、そのマンナンのモデルとしてパン酵母マンナンを選択した。パン酵母マンナンは、真菌型マンノプロテイン糖鎖として最も基本的な構造をしている。その平均構造は既に明らかにされていて、また、調製が比較的容易であることから、モデルとしてふさわしい。森林土壌懸濁液より、パン酵母マンナンを主たる炭素源とした液体培地にて集積培養した後、寒天平板上でコロニーを形成した菌を選択した。液体培養上清に、強いパン酵母マンナン分解酵素活性を示す一細菌を選定した。電子顕微鏡による形態観察(Fig. 1) 及び生理的分析(Table 1) から、特に、周鞭毛で運動性をもつ好気性桿菌で内生孢子形成能を有するという特徴より、*Bacillus* 属であると同定し、*Bacillus* sp. M-90 と命名した。

#### ・酵素の精製

酵素活性は、パン酵母マンナンを基質として用い、加水分解により遊離した糖の還元力を Nelson-Somogyi 法で測定した。

パン酵母マンナン分解酵素活性は培地中のパン酵母マンナンにより誘導された。液体培養上清より、陰イオン交換樹脂を二回、ゲル濾過一回の各カラムクロマトグラフィにより、蛋白質的に均一な標品を得た(Table 2)。

#### ・酵素の諸性質

精製酵素はゲル濾過的に約 38 万、SDS-PAGE 的には約 19 万の分子量を示し、各々より調製された標品の N 末端配列が一致していることから、ホモダイマーを構成していると考えられた。24 時間処理において pH5.0 ~ pH8.0 で安定で、標準の反応系における加水分解反応の至適 pH は 6.0 であった。pH5.0 より低い pH で急速に安定性及び活性を失った。10 分間の処理による温度安定性は 40℃までで、標準の反応系における加水分解反応の至適温度は 45℃であった。等電点は 3.6 だった。(Table 3) 金属イオン等の添加物の影響では、銅、ニッケル、水銀の各イオン及び EDTA により著しく活性が阻害されたが、これまでに知られている、真核生物由来の  $\alpha$ -1,2-mannosidase の阻害剤であるデオキシマンノジリマイシンでは阻害をうけなかった。水溶性カルボジイミド試薬は蛋白質中のカルボキシル基の修飾に用いられる。精製酵素に対して各濃度 ([R]) の水溶性カルボジイミドを作用させ、酵素の失活の速度定数  $k'$  を決定し、 $k'$  の対数値を  $\log [R]$  に対してプロットした時の直線の傾きは、酵素活性の失活に関わる修飾残基数を与える。水溶性カルボジイミドとして 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (図中 EDC と略す) を用い解析を行ったところ、一つのカルボキシル基が修飾されることにより活性を失うことが示された(Fig. 2)。

#### ・基質特異性

$\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -1,6 の各マンノビオースに精製酵素を作用させ、HPLC によるゲル濾過でその生成物を解析したところ、 $\alpha$ -1,2 マンノビオースのみに作用することが示された(Fig. 3)。

非還元末端に  $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3 マンノシド結合をそれぞれ有するマンノテトラオースに精製酵素を作用させたところ、非還元末端が  $\alpha$ -1,3 マンノシド結合のマンノテトラオースに対しては全く作用しないことが示された(Fig. 4)。

パン酵母マンナンに対しても経時的に単糖を遊離する。以上のことから本酵素は  $\alpha$ -1,2-mannoside 結合に特異的で、非還元末端から *exo* 型に作用してマンノースを遊離することがわかった。

#### ・糖鎖構造解析への有効性

野性株型パン酵母マンナンに対して *Bacillus* sp. M-90 の  $\alpha$ -1,2-mannosidase を作用させ、生成物をゲル濾過により分離し、その高分子量画分について  $^1\text{H-NMR}$  で解析を行った。マンナンの側鎖のうち非還元末端に  $\alpha$ -1,3 マンノシド結合を持つものが残され、 $\alpha$ -1,2 マンノシド結合のみで構成される側鎖が除かれ、 $\alpha$ -1,6 マンノシド結合からなる主鎖が「露出」したと推察された(Fig. 5)。高分子量マンナンに対して、立体構造的な問題等によって、有効に作用しない可能性も考えられるため、側鎖に  $\alpha$ -1,3 マンノシド結合をもたない、パン酵母変異株(X2180-1B4) 型マンナンを用いて同様に解析を行った。この場合、側鎖は完全に消化され、 $\alpha$ -1,6 マンナンが生成されたことが示された(Fig. 6)。

N-結合型ハイマンノース型糖鎖の骨格構造である M9 オリゴ糖鎖に対して本酵素を作用させ、順相 HPLC にて反応を解析したところ、 $\alpha$ -1,2-mannoside 結合に完全に作用したことが示された(Fig. 7)。

## 第二章 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子の解析

#### ・部分アミノ酸配列の決定

精製酵素標品を尿素(8 M; pH8.9 Tris-HCl 10 mM)で変性させた後、リシルエンドペプチダーゼ処理によって断片化し逆相 HPLC で分画した。各画分について精製の後、プロテインシーケンサでアミノ酸配列を決定した (Table 4)。

#### ・ $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子のクローニング(Fig. 8)

もっとも長い断片(No. 8; 42 残基)の配列より PCR 法の degenerate primer セットを設計した(Fig. 9)。 *Bacillus* sp. M-90 のゲノム DNA を鋳型とし PCR 法により増幅された DNA 片をクローニングし塩基配列を確認したところ、元としたペプチドのアミノ酸配列に一致することが確認された。これを RI 標識しプローブとして用いることにした。ゲノム DNA を *Sau*3A I で部分消化し、5 kb ~ 8 kb の DNA 断片を回収した。プラスミドベクターである pBluescript II KS+ の *Bam* HI 部位に導入して作成したゲノム DNA ライブラリより、コロニーハイブリダイゼーションにより本酵素遺伝子を含むクローンを 6 個得た。

#### ・遺伝子配列の決定

各種制限酵素消化による切断のパターンから各クローンの相対的配置を決定した (Fig. 10)。サブクローニング及び決定した配列を元にシーケンスプライマーを作成することにより本酵素をコードする全配列を決定した (Fig. 11)。決定された遺伝子を *aman2* と命名した。*aman2* は全長 5928 ヌクレオチドで 1976 アミノ酸をコードしていた。推定される開始コドンの上流には SD 配列がみられた。hydropathy plot より、開始 Met から 37 アミノ酸が分泌のシグナル配列であると推定された。終止コドン下流には大規模な相補的折り返し配列が見られた。*aman2* は GC 含量が 69% と非常に高かった (Fig. 12)。

#### ・大腸菌における *aman2* の発現

得られたクローンより、*aman2* 全長を含むものを作成した。これを有する大腸菌をアンピシリンを含む液体培地で 23℃、5 日間、嫌氣的に静置培養の後、超音波破碎機で菌体を破壊し、遠心分離により可溶性画分を調製した。SDS-PAGE にて、native な酵素と同じ位置に蛋白のバンドが検出され、*Bacillus* sp. M-90 の  $\alpha$ -1,2-mannosidase に対する抗体ともクロスした。また、N 末端配列も native な酵素と一致した (Fig. 13)。可溶性画分よりゲル濾過で分子量 38 万の位置に左右対称的なピークとして溶出し  $\alpha$ -1,2-mannosidase 活性が検出された。大腸菌で発現された酵素も二量体を形成していることが推定された。本酵素の特徴の一つである巨大な分子量のために大腸菌体内よりゲル濾過の一段階で精製することが可能であった。

## 第二部 *Bacillus circulans* TN-31 の $\alpha$ -1,6-mannanase について

*Bacillus circulans* TN-31 は本研究室中島により単離された。

*Bacillus circulans* TN-31 は培地中の  $\alpha$ -1,6 マンナンにより誘導的に  $\alpha$ -1,6-mannanase を産生する。

#### ・酵素の諸性質

諸性質について Fig. 14 にまとめた。本酵素は  $\alpha$ -1,6 マンナンに対して *endo* 型に作用する。二糖以下には作用しない。

水溶性カルボジイミドによりカルボキシル基を修飾することで、一つのカルボキシル基が修飾されることにより活性が失われることが示された (Fig. 15)。

#### ・ $\alpha$ -1,6-mannanase 遺伝子のクローニング

精製酵素標品を 8 M の尿素で変性させた後、リシルエンドペプチダーゼ処理によって断片化し、各断片のアミノ酸配列を決定した。決定した断片のうち、本酵素の N 末端を含む断片と、最も長く配列が決定できた断片のアミノ酸配列より、PCR 法の degenerate primer セットを設計した (Fig. 16)。*Bacillus circulans* TN-31 のゲノム DNA を鋳型とした PCR 法により増幅された 0.6 kb の断片をクローニングし、塩基配列の確認をした。ゲノム DNA を *Sau* 3AI で部分消化し、6 kb 前後の DNA 断片を回収し、

pBluescript II KS+ の *Bam* HI 部位に導入し、ゲノム DNA ライブラリを作成した。クローン化した 0.6 kb の DNA 断片を蛍光標識しプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーションにより検索を行ったところ、5つの陽性コロニーを得た。菌体内に  $\alpha$ -1,6 マンナーゼ活性が検出された一株を選定した。

#### ・遺伝子配列の決定

クローンは 10 kb の挿入断片を有していた。サブクローニング及び決定した配列を元にシーケンスプライマーを作成することにより本酵素をコードする全配列を決定し *aman6* と命名した (Fig. 17)。*aman6* は全長 1767 スクレオチドで、589 アミノ酸をコードしていた。推定される開始コドンの上流には SD 配列がみられた。hydropathy plot より、開始 Met から 35 アミノ酸が分泌のシグナル配列であると推定した。BLAST によるアミノ酸配列の相同性検索で、*Bacillus* 及び *Clostridium* 属の xylanase と弱い相同性 (200 アミノ酸中 70 アミノ酸程度) が示された。GC 含量は 50% であった (fig. 18)。

#### ・大腸菌における *aman6* の発現

*aman6* を有する大腸菌をアンピシリンを含む液体培地で 37℃、一晚振盪培養の後、超音波破碎機で菌体を破壊し、遠心分離により可溶性画分を調製した。陰イオン交換樹脂、ゲル濾過、ヒドロキシアパタイトの各カラムクロマトグラフィにより蛋白質的に均一に精製された。SDS-PAGE にて、native な酵素と同じ位置に蛋白のバンドが検出され、その N 末端配列も一致した。また、*Bacillus circulans* TN-31 の  $\alpha$ -1,6-mannanase に対する抗体とクロスした (Fig. 19)。

## 考察

本研究により、パン酵母型マンナン糖鎖に対して、結合様式に依存して特定の側鎖を取り去り、露出した主鎖を切断して糖フラグメントを回収する、といった解析法が可能になった。また、大腸菌で生産する事が可能になったため、道具として、酵素を安定して供給することができる。

近年の分子生物学の発展により、多くの遺伝子配列が明らかになってきた。糖質加水分解酵素 (EC. 4.3.2.\*) については、Bernard Henrissat (AFMB-CNRS; フランス) によるグループわけ (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf.html>) が知られている。それによると  $\alpha$  マンノシド結合に作用する酵素グループとして Family 38 と Family 47 の二つがあるとされている。前者は  $\alpha$  mannosidase (EC 3.2.1.24) と  $\alpha$ -1,3-1,6-mannosidase (EC 3.2.1.114) が、後者は  $\alpha$ -1,2-mannosidase (EC 3.2.1.113) が属する。この二つのグループとも真核生物のみが所属する (Table 5)。本研究は細菌由来の  $\alpha$  マンノシダーゼ、 $\alpha$  マンナーゼについて遺伝子配列を明らかにした最初の報告である。この報告により、*aman6* については Family 76 が新設された。*aman2* はユニークな存在でありクラス外とされた。 $\alpha$  マンナンは原核生物には存在しないことから、細菌の  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -mannanase は真核生物が地球上に誕生した後に獲得されたも

ので、真核生物由来の酵素とは異なる分子進化の過程を経てきたものと考えられる。

*aman2* は遺伝子及びアミノ酸配列の相同性検索で既知の配列と相同性のあるものはなかった。分子生物学に於てこれまでに我々が蓄積してきた知識は低 GC 含量の生物によるものである。例えば、代謝抑制を考えた場合、枯草菌では遺伝子上流に CRE (catabolite responsive element) が存在し、遺伝子の発現が制御される。*Bacillus* sp. M-90 の  $\alpha$ -1,2-mannosidase も培地中のグルコースにより誘導が抑制されるが、高 GC 含量であるため枯草菌の cre による制御のシステムとは違う、高 GC 生物としてのものを持っていると考えられる。

#### 要約

- ・ 土壌細菌より新規な  $\alpha$ -1,2-mannosidase を発見し糖鎖構造解析の「道具」として有用であることを示した。遺伝子配列を決定し、高 GC 含量であることを明らかにし、これまでに知られていないユニークな存在であることを示した。大腸菌で発現させた。

- ・ 現在までに知られている  $\alpha$ -1,6-mannanase として唯一のものである *Bacillus circulans* TN-31 の  $\alpha$ -1,6-mannanase の遺伝子配列を決定し、大腸菌で発現させた。

#### 原著論文

Maruyama, Y., Nakajima, T., Ichishima, E. (1994) A 1,2- $\alpha$ -D-mannosidase from a *Bacillus* sp.: purification, characterization, and mode of action, *Carbohydr. Res.* **251**, 89-98

Maruyama, Y., Nakajima, T. The *aman6* gene encoding a yeast mannan back bone degrading 1,6- $\alpha$ -D-mannanase in *Bacillus circulans* : cloning, sequence analysis and expression. (submitted to *Biochim. Biophys. Acta*)

Maruyama, Y., Nakajima, M., Nakajima, T. Cloning and expression of a bacterial 1,2- $\alpha$ -D-mannosidase gene (*aman2*) in *Bacillus* sp. M-90. (To be submitted to *Journal of Bacteriology*)

#### 参考論文

Nakajima, T., Maruyama, Y., Sato, A., Matsumoto, K., Suenaga, M., Ichishima, E. (1996) Purification and characterization of an *endo*  $\alpha$ -1,3-D-mannanase from *Flavobacterium* sp. AS-9. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 44-47



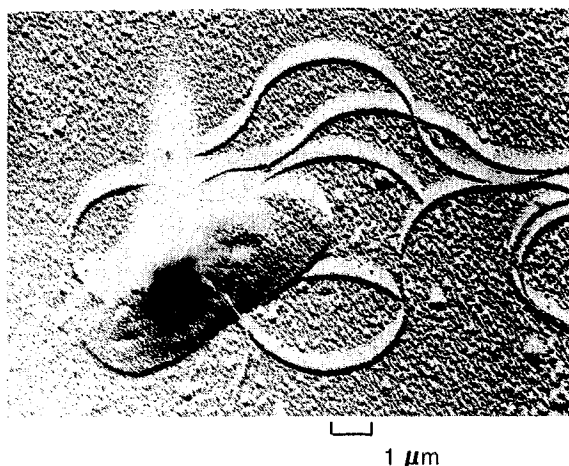


Fig. 1 Electron micrograph of *Bcillus* sp. M-90

Table 1 Bacteriological characteristics

Morphological		
form and size	rod	0.2 x 0.7 μm
mobility	motile, peritrichous flagella	
gram strain	positive	
spore	formed	
agar plate	round, smooth, convex, clear and lemon yellow	
Physiological		
catalase	produced	
oxidase	not produced	
optimum temperature for growth	26 - 30 °C	
cell wall diamino acid	LL- or no DAP	
quinon type	menaquinone	

Table 2 Purification of α-1,2-mannosidase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (μkat)	Specific activity (mkat/kg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Cultural filtrate	93	1.3	14	1.0	100
DEAE-TOYOPEARL 650S (1st)	8.7	1.0	120	8.6	81
DEAE-TOYOPEARL 650S (2nd)	6.0	0.9	140	10	66
TOYOPEARL HW-55F	2.4	0.6	250	18	47

Table 3 Properties of α-1,2-mannosidase

Molecular weight	(gel-filtration) 380,000 (SDS-PAGE) 190,000
Isoelectric point	3.6
N-Terminal sequence	AAGGTFA...
Optimal pH	6.0
Optimal temp.	45°C
pH stability	5.0~8.0
Thermal stability	~40°C
Mode of action	exo-type
Specificity	Man(α1-2)Man linkage
Specific activity for mannan*	0.25 kat/kg
K <sub>m</sub> for mannan*	0.02%

\* *Saccharomyces cerevisiae* mannan

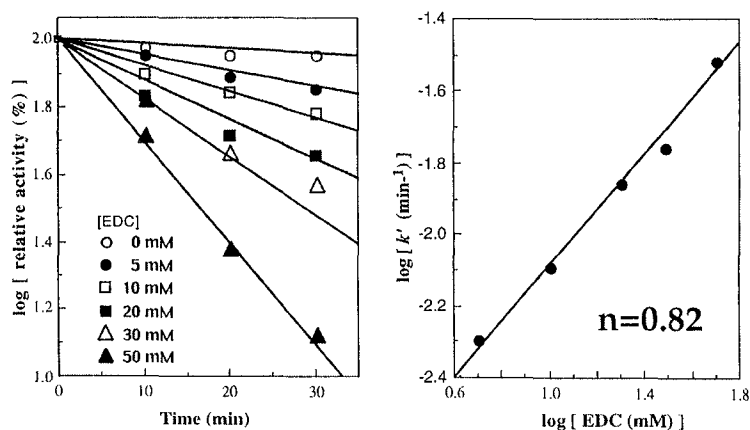


Fig. 2 Inactivation of α-1,2-mannosidase by EDC-NH<sub>4</sub>Cl

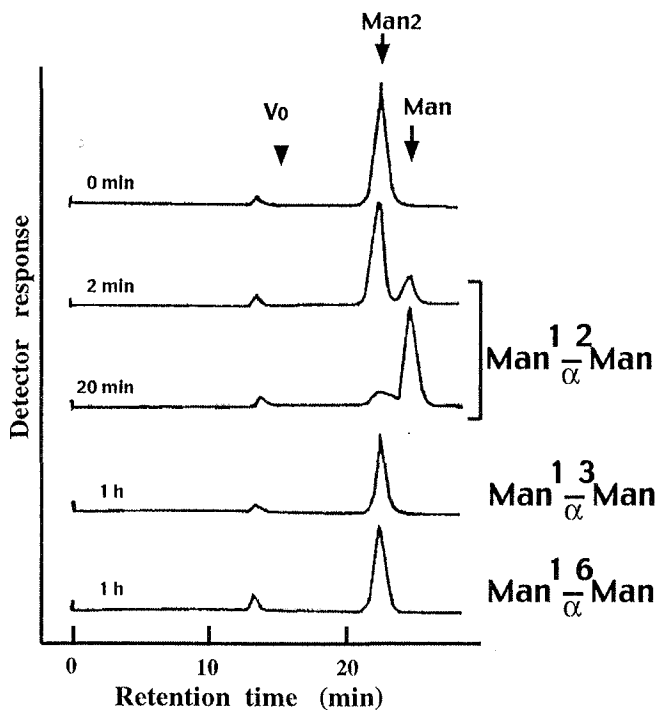


Fig. 3 Susceptibility of  $\alpha$ -linked mannosides to the  $\alpha$ -1,2-mannosidase

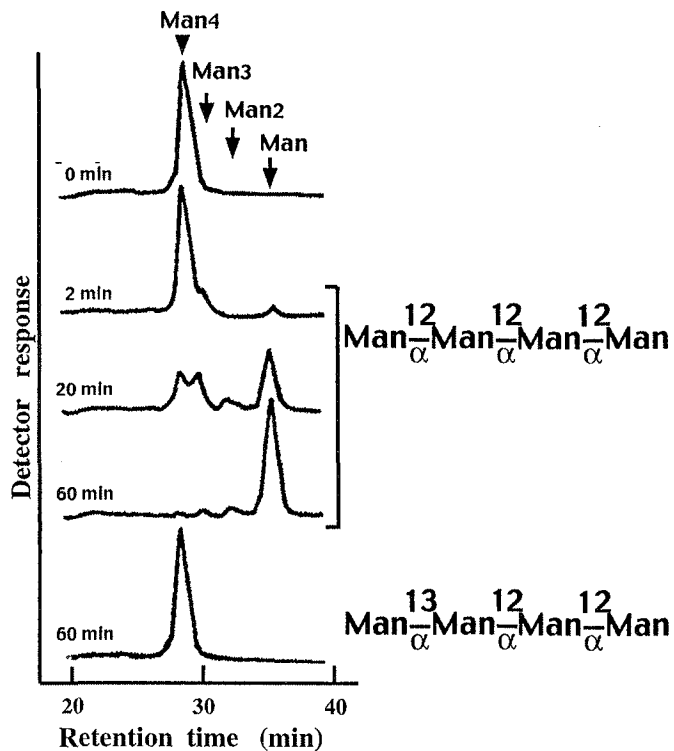


Fig. 4 Time course of hydrolysis of  $\alpha$ -1,2-mannosidase

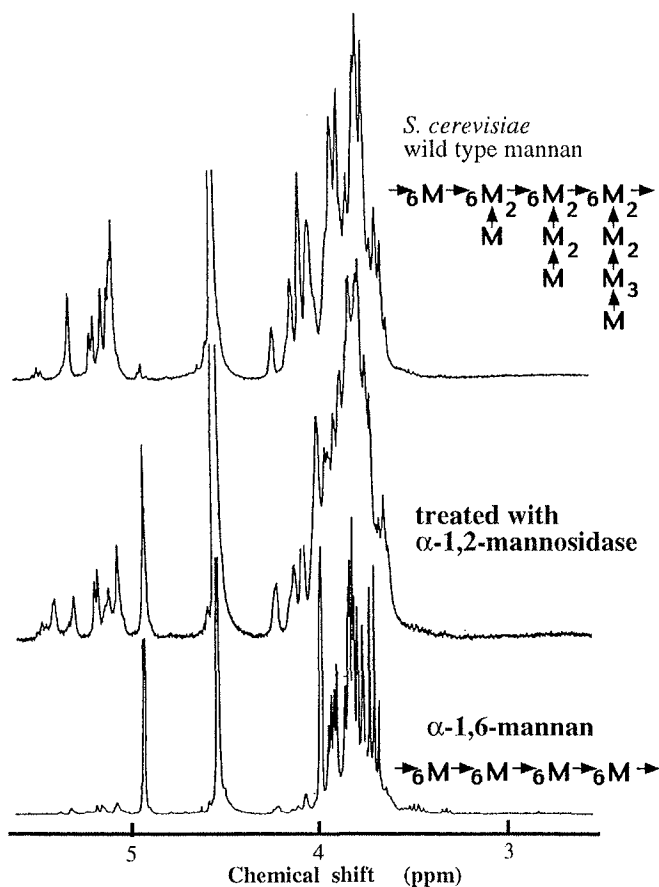


Fig. 5  $^1\text{H}$  NMR spectra of the native and the enzyme-digested mannans from *S. cerevisiae* wild type

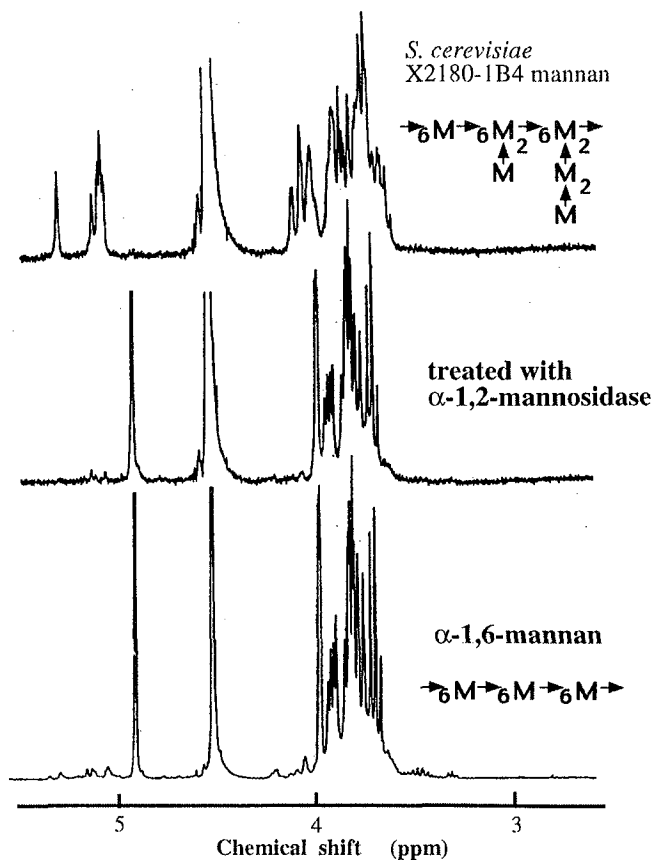


Fig. 6  $^1\text{H}$  NMR spectra of the mutant mannan and the residue produced by the mannosidase treatment

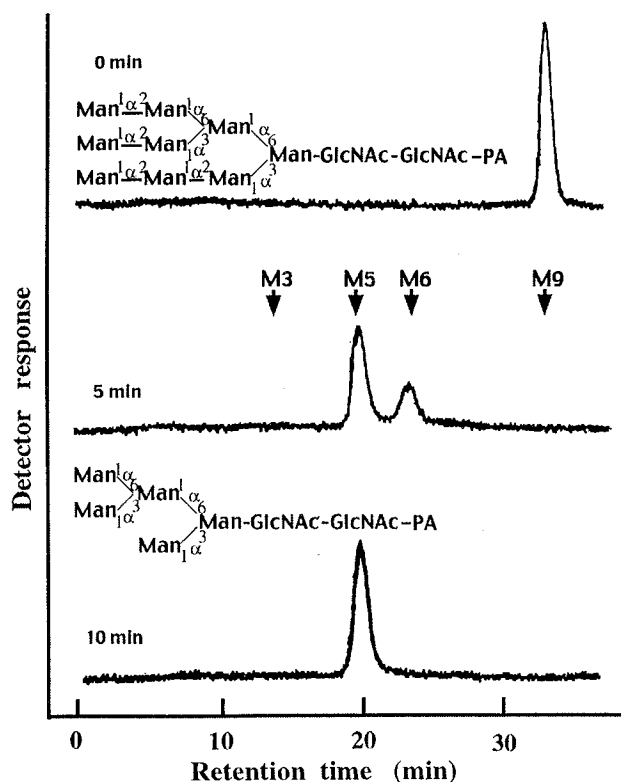


Fig. 7 HPLC of the mannosidase digests of  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$

1	LTRDDLGGWK
2	DASG
3	SGPVSIGQYTLTSAK
4	ALQYSGRHLAAGPASSTTVYSDVDVA
5	NTAIYATAPIDLAVDGDGA
6	YVAGVSINGAPITETTFDGLVRN
7	RLNLYPNSQFENTGTRADPV
8	INADGFVQGGTLTIPGSTLTLYDLPAIPAGAPDNITGEGQTVK
9	VSRIDAETPVSTTAGQNGAIAAELVIPVDAVDGS
10	AAGGTFA
11	TDGSTQQVTISLGD
12	LEGLSLDGTWT

Table 4 N-Terminal sequences of lysylendopeptidase digests

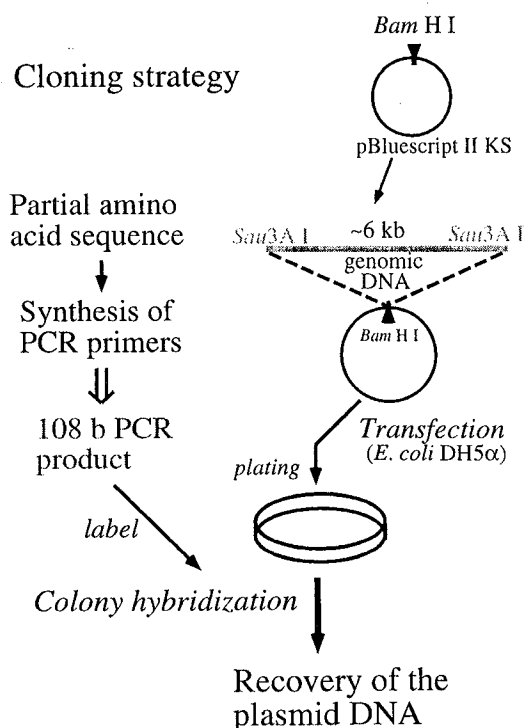


Fig. 8 Cloning strategy

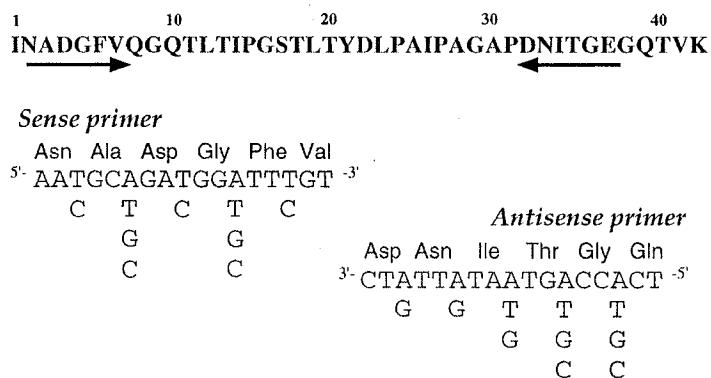


Fig. 9 A design of primers for PCR

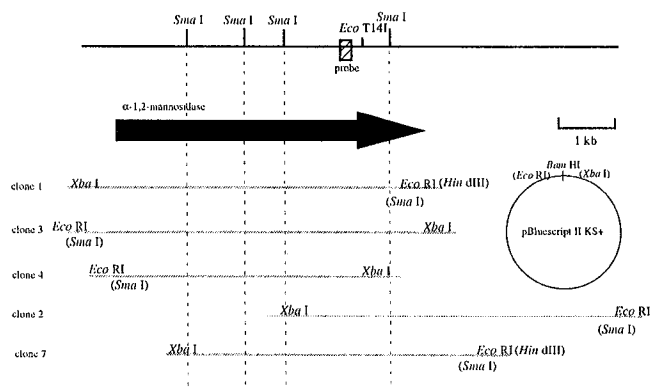


Fig. 10 Clones

Fig. 11 Nucleotide and deduced amino acid sequences of  $\alpha$ -1,2-mannosidase gene, *aman2* from *Bacillus* sp. M-90. The deduced amino acid sequences which are identical to the sequence obtained from the peptides of  $\alpha$ -1,2-mannosidase purified from the bacterium, are underlined. Positions of the sequences used to prime are shaded.

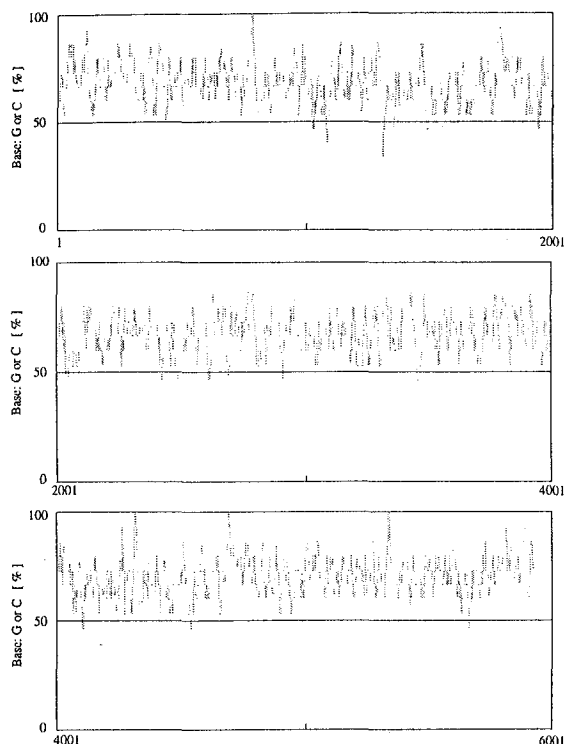


Fig. 12 GC content distribution diagram of *aman2*

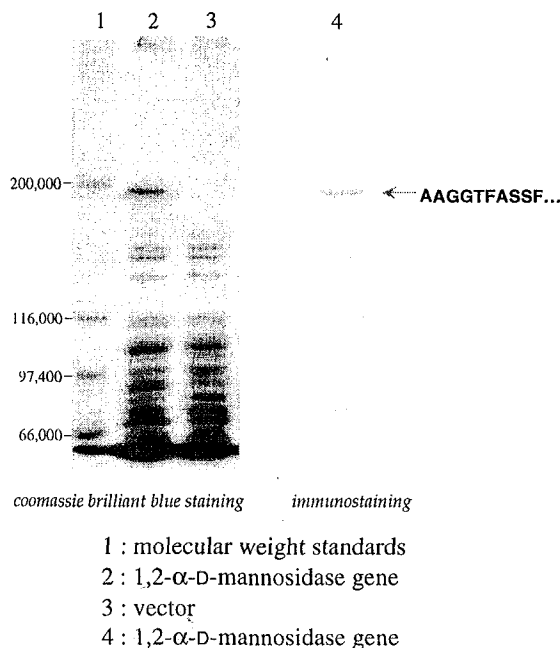
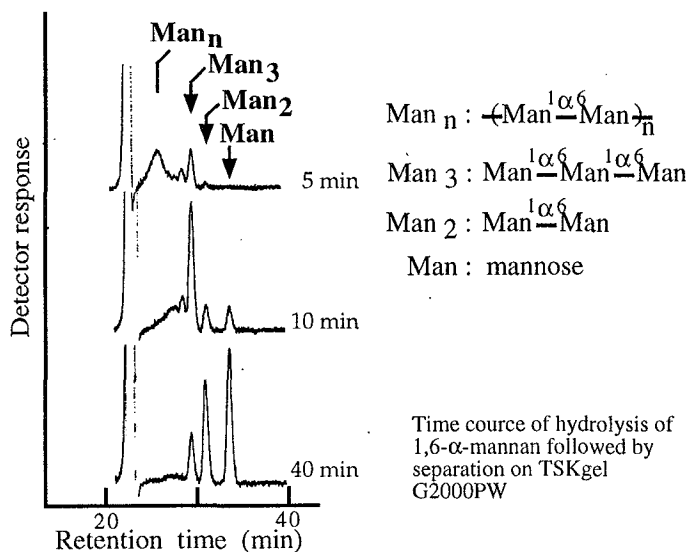


Fig. 13 Profiles of SDS-PAGE and immunostaining of the recombinant  $\alpha$ -1,2-mannosidase expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . The mouse polyclonal antibody against native  $\alpha$ -1,2-mannosidase from *Bacillus* sp. M-90 was used for immunostaining. The N-terminal amino acid sequence is indicated.



Molecular weight	(gel-filtration)	130,000
	(SDS-PAGE)	55,000
N-Terminal sequence	YTASDGDTA...	
Optimal pH	6.0	
Optimal temp.	50°C	
pH stability	5.0~8.0	
Thermal stability	~55°C	
Mode of action	endo-type	
Specificity	unbranched 1,6- $\alpha$ -mannan	

Fig. 14 Properties of *Bacillus cilulans* TN-31  $\alpha$ -1,6-mannanase

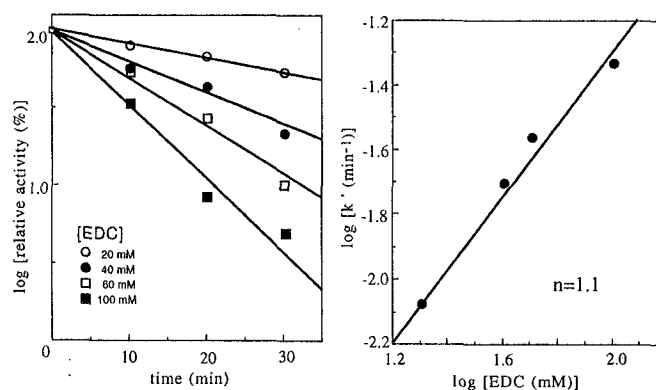


Fig. 15 Inactivation of  $\alpha$ -1,6-mannanase by EDC-NH<sub>4</sub>Cl

YTASDGDGTAMKAFNDTFWDPNAK

[N-Terminus]

Sense primer

ATGAAAGCATTTAATGA  
G T C C  
C

TTTGGGATCCAAATGC  
C C T C  
C

VFDRIEIEHGAVPDATHYNQGCYIGSAV

Antisense primer

TAACCTTAACCTTGATAC  
T C T C G  
G

TGAGTAATATTAGTTCC  
T G G G C  
C

Fig. 16 A design of primers for PCR

-250 TCCTGAAATCCAGAAATACGCAGCCGGTTCGTTTCCTGTGACGTGGGCTGGCAAAGCGTACCCGTTTCATTGAAGCATCATGAAAAACATTCTGATGGG  
-150 CAAAGCCCCGATCACCGAAGTGGATGTGATGGCCGAAAAAATCAACAAAGTGATTACGACCGGCAAGTAGTAACCGGAACCGTTAAGCTCATGAAGCCGA  
-50 TCATGAATGGAACGGATCGGCTTCGATTGAAAAATAGAGGAGGAACATTTCATGTCTACTAAGATCAGGTCAACTTTTCAGGTTTCTGGCGGTGCCTCTGGC  
SD M S L R S G Q L F R F L A V P L A  
51 TATCGCGCTCATGCTCGGTTCCATGCCGGGCATCGGAACGTCCAAAGCCTACGCCATACCGCATCAGATGGGATACAGCGATGAAAGCTTTTAACGAT  
I A L M L G S M P G I G T S K A Y A Y T A S D G D T A M K A F N D  
151 ACATTTTGGGATCCGAACGCCAAGATGTTCTGGAAGGACTCGAAGCGCGAAAAGCATCAAGACTTCTGGGTGGAGGCTGAGCTGTGGGAATTGGTCATGG  
T F W D P N A K M F W K D S K R E K H Q D F W V E A E L W E L V M D  
251 ATGCGTATCAGCATACATCCGATCTGCTTTGAAAGCCGAGCTTAAACGCAATCGACGATGTATATGACGGCACCCTCGCCAAGTACGGGCAAGATTG  
A Y Q H T S D P A L K A E L K T Q I D D V Y D G T V A K Y G Q D W  
351 GACGAATAACCCGTTCAATGACGATATTATGTGGTGGGCGATGGGCGAGCGCAGAGCCTATCAAATCACCGGAACCCAAAGATATTGGAAGCCGCGAGG  
T N N P F N D D I M W W A M G S A R A Y Q I T G N P R Y L E A A R  
451 GATCATTTCGATTTTGTGTACGATACGCAGTGGGATGAAGAGTTCGCAAAACGGCGGCATTTGGTGGCTGAACAGCGACCATAATACCAAAAATGCGTGCA  
D H F D F V Y D T Q W D E E F A N G G I W W L N S D H N T K N A C I  
551 TTAATTTCCCGCGCGCAAGCGCGCTTTATCTTTACGATATTACGAAAGATGAGCATTTATCTAAACGCGGCAACAAAATATTCAGATGGGGCAAAAC  
N F P A A Q A A L Y L Y D I T K D E H Y L N A A T K I F R W G K D  
651 GATGCTTACGACGCGAAACGGAAGTGTTCGACCGCATCGAAATGAACATGGCGCGTTCCGGATGCCACTCACTACAACAGGGTACATACATTGGG  
M L T D G N G K V F D R I E I E H G A V P D A T H Y N Q G T Y I G  
751 TCGGCCGTCGGATTGTATAAGCGACCGGAAATGCCGTTTACCTCGATGACGCGGTCAAAGCCGCTAAATTACCAAAAACCATCTGGTGGATTCAAACG  
S A V G L Y K A T G N A V Y L D D A V K A A K F T K N H L V D S N G  
851 GGGTGTGTAATTATGAAGGTCCCAACGGGGATCTGAAAGCGCGCAAAACGATCCTTATGCGCAATCTGGCCCATCTGCAAAAAGACTGGATGAAACCGG  
V L N Y E G P N G D L K G G K T I L M R N L A H L Q K T L D E T G  
951 CCAGTACCCGAATTCAGTGTGAATTCGACGAATGGCTTGCATTCAATATCGAAATGGCCTGGAGTCATCGGAATTCGGATCATATCGTGGATGGAAC  
Q Y P E F S A E F D E W L A F N I E M A W S H R N S D H I V D G N  
1051 TGGGCGGACAACTGCTGTCCGGAACCTATGAATCCTGGTCATCGGCCGACGCGTTCAAGCTTTAAACGGTATCAAACCGATGGAAGCGGAGCTTCATT  
W A G Q L L S G T Y E S W S S A A A V Q A L N G I K P M E A E L H Y  
1151 ATGGTGTAAAAACCCCTTCGATAAAATCGAAGCGGAACGCTACAATATCGGGTCCGGTTTCGTTCTGGAAGGCGGTTTCAAGGTTTCGCTGCAATTAGG  
G V K N P F D K I E A E R Y N I G S G F V L E G A F E G S L Q L G  
1251 CGGAATACAGCATGGCTCTTATGCCGCTTACAAAAATGTGGACTTCGGATCCGACGGTCCGATCGGGTTTCATTGCCAGAGCGTCCAGCGGAACAGCGCGA  
G I Q H G S Y A A Y K N V D F G S D G A I G F I A R A S S G T G G  
1351 GGTAAACATTGAGATCCGGCTTGATTCCAAGGATGGCCCCAAAGTCGGGACCTTGAACGTAGAGGGAACGGGCGACTGGAATCAATATATCGATGCCGTCA  
G N I E I R L D S K D G P K V G T L N V E G T G D W N Q Y I D A V T  
1451 CCCTCCTTAAAGATGACCAGGAGCGCCGAGCAGGATAACCGGCGTCCATGATGTGTATCTTGTCTTACCAAGACGAACGACGATTATTTATTCAATTT  
L L K D D Q G A P S T I T G V H D V Y L V F T K T N D D Y L F N L  
1551 GAACTGGGTTAAATTCAACAACGAGACCCGACGGAACCGACGCTATGCCAAGCTTAAAGCGGAAATTACGACAGCAGCGAAGGACTTAGTAAACAT  
N W V K F T T T D P T E T D A Y A K L K A G N Y D S S E G L S K H  
1651 GCCGAGTTCGGATATTGGACGCAATCCATCACAATGCCTATGCCTCTTATGAAGGAATTGATTTCGGATCGATAAATAGGCGGCACCTGCGAGCGCCAT  
A E F G Y L D A I H H N A Y A S Y E G I D F G S I N R R H L R A P W  
1751 GGCAACATAGAGGAAGGTAGATGCTTTTCCGGGTACATTCAGCGAGAAGGCAAAGTAATACACCAAGTAGATCGGGATCGATTGTAAACGAATTGGTAG  
Q H R G R \*  
1851 GCGATTTCGCCCCATTCCTTGCCATCAAATGACTGAACAAGTGAACGGGCGCATCAAATCCAGAGAGATATGGCCGGTTCGCACGGCTTGGGGAATGC  
1951 CGAGGCCATTTCGTGACGAAACTGGAACCCAGAGCGCAGCTTCGCTAAAGCGGATATAACCGACCATTCCTCGGTTCCGTATTCTCCGAGCGCGTAGTC

Fig. 17 Nucleotide and deduced amino acid sequences of  $\alpha$ -1,6-mannanase gene, *aman6* from *Bacillus circulans* TN-31. The deduced amino acid sequences which are identical to the sequence obtained from the peptides of  $\alpha$ -1,6-mannanase purified from the bacterium, are shaded. Positions of the sequences used to PCR primers are underlined.

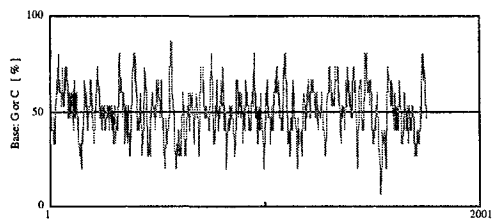
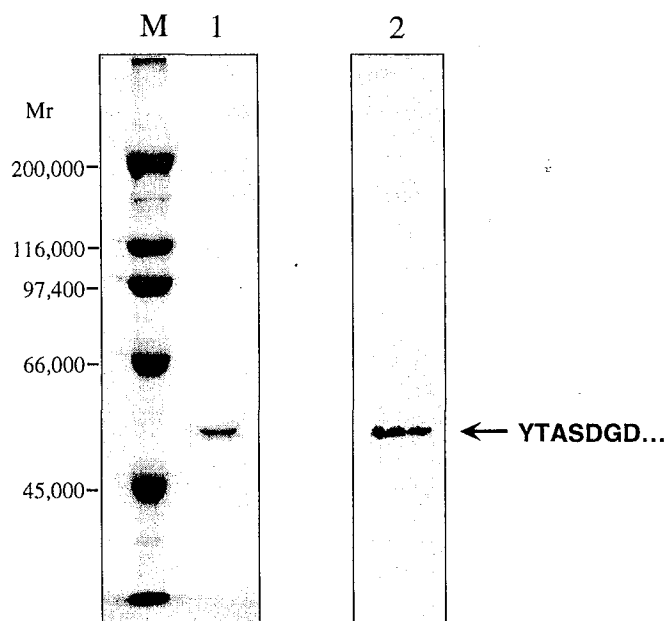


Fig. 18 GC content distribution diagram of *aman6*



coomassie brilliant blue staining immunostaining

Fig. 19 Profiles of SDS-PAGE and immunostaining of the recombinant  $\alpha$ -1,6-mannanase. The rabbit polyclonal antibody against native  $\alpha$ -1,6-mannanase from *Bacillus circulans* TN-31 was used for immunostaining. The N-terminal amino acid sequence is indicated. M indicates marker proteins.

Table 5 Classification of glycosyl hydrolase\*

Family 38

Description: Alpha-mannosidases (EC 3.2.1.24 / EC 3.2.1.114).  
PROSITE: None  
3D structure status: Not available  
Reaction stereochemical outcome: Retained anomeric configuration  
Catalytic nucleophile/base: Asp  
Catalytic proton donor: ?  
Clan: None  
Known taxonomic range: eukaryotae.

MA2B\_BOVIN (Q29451), MA2B\_FELCA (Q46432), MA2B\_HUMAN (O00754),  
MA2B\_MOUSE (O09159), MA2X\_HUMAN (P49641), MAN1\_RAT (P21139),  
MAN1\_YEAST (P22855), MAN2\_DROME (Q24451), MAN2\_HUMAN (Q16706),  
MAN2\_MOUSE (P27046), MAN2\_RAT (P28494), MANA\_DICDI (P34098),  
MANE\_PIG (Q28949)

Family 47

Description: Alpha-mannosidases (EC 3.2.1.113).  
PROSITE: None  
3D structure status: Not available  
Reaction stereochemical outcome: Inverted anomeric configuration  
Catalytic nucleophile/base: ?  
Catalytic proton donor: ?  
Clan: None  
Known taxonomic range: eukaryotae.

M121\_DROME (P53624), M122\_DROME (P53625), MA12\_HUMAN (P33908),  
MA12\_MOUSE (P45700), MA12\_PENCI (P31723), MA12\_RABIT (P45701),  
MANX\_MOUSE (P39098), MNS1\_YEAST (P32906), YH04\_YEAST (P38888)

\* GLYCOSID.TXT; Amos Bairoch,  
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>

## 論文審査結果要旨

多糖は蛋白質や核酸と同様に典型的な鎖状分子でありながら、主に多様性に起因する解析の困難さから、分子生物学的解析はあまり進んでいない。また近年、糖鎖は細胞内外における情報伝達をになう働きがあることが明らかとなってきた。特に、真核細胞の細胞膜あるいは酵素に存在する糖蛋白質糖鎖は、細胞間の認識、あるいは酵素蛋白質の安定性、輸送の標識などに深く関係している。糖蛋白質糖鎖の中で、N結合糖鎖の基本骨格はマンノースを構成糖とし、また、真菌類の細胞壁の最表層にも、 $\alpha$ マンノースで構成される高マンノース型に分類される糖鎖が存在する。これら高マンノース型糖鎖は $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,6の三種類の $\alpha$ マンノシド結合により作られており、各々の結合様式に特異的に作用する加水分解酵素を得ることは、糖鎖の構造や機能の解析において飛躍的な進歩をもたらすと考えられる。

候補者は、高マンノース型糖鎖を特異的に分解する新規な $\alpha$ -1,2-mannosidaseを産生する細菌、*Bacillus* sp.M-90を土壤中より単離し酵素を精製し諸性質を決定した。更に本酵素の遺伝子のクローニングと発現に成功した。

候補者の単離精製した細菌の $\alpha$ -1,2-mannosidaseは、これまでに知られている、真菌、動物由来の $\alpha$ -1,2-mannosidaseと比較して10倍以上比活性が強いこと、また、真核生物由来の酵素での拮抗阻害剤として知られているデオキシマンノジリマイシンにより阻害をうけない事、等、現在まで報告されていない新規な性質を持つ酵素であることが本研究により示された。本酵素はオリゴ糖にも多糖にも同様に $\alpha$ -1,2-mannoside結合のみに特異的に作用し、糖鎖構造解析試薬として有効であることも明らかにした。決定した一次構造から、本酵素が全く新しい $\alpha$ -1,2-mannosidaseであることを明らかにした。またこの研究はGC含量の高い生物として先駆的である。

また候補者は、現在までその遺伝子が得られていなかった細菌、*Bacillus circulans* TN-31の $\alpha$ -1,6-mannanaseについてクローニングし、その遺伝子の発現にも成功した。機能及び遺伝子配列が決定された $\alpha$ -1,6-mannanaseは、候補者のクローニングした*Bacillus circulans* TN-31株より得られたものが唯一のものである。

本論文で明らかにした二つの新規な遺伝子配列はポストゲノム時代にむけて有用なプローブとしての役割も期待される。また、本研究により両酵素を組み合わせる用いることにより、糖鎖構造解析において新たな手法がとれる可能性が示された。

以上、審査員一同は、候補者は博士(農学)の学位を供与されるに十分な資格を有すると認定した。